



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Institutionen för norrländsk jordbruks-  
vetenskap



## Endofytiska svampar i vallgräs

– levnadssätt, förekomst och effekter på gräs och  
gräsätare

*Caroline Jöngren*

Kandidatuppsats i biologi 15 hp • Agronomprogramet mark/växt  
Examensarbete nr 1, 2014 • Institutionen för norrländsk jordbruksvetenskap  
Fakulteten för naturresurser och jordbruksvetenskap • Umeå 2014

SLU, Sveriges lantbruksuniversitet

***Endofytiska svampar i vallgräs  
- levnadssätt, förekomst och effekter på gräs och  
gräsätare***

*Endophytic fungi in forage grasses  
- life conditions, occurrence and effects on grasses and herbivores*

*Caroline Jöngren*

<b>Handledare:</b>	Kerstin Huss-Danell, SLU Institutionen för norrländsk jordbruks- vetenskap
<b>Biträdande handledare:</b>	Anja Bylin, SLU Institutionen för norrländsk jordbruks- vetenskap
<b>Examinator:</b>	Cecilia Palmborg, SLU Institutionen för norrländsk jordbruks- vetenskap
<b>Kurstitel:</b>	Självständigt arbete i biologi- kandidatarbete 15hp
<b>Kurskod:</b>	EX0689
<b>Nivå:</b>	Grundnivå, G2E
<b>Program/ Utbildning:</b>	Agronomprogrammet, Mark/Växt
<b>Utgivningsort:</b>	Umeå
<b>Utgivningsår:</b>	2014
<b>Omslagsbild:</b>	Endofytisk svamp, <i>Epichloë</i> 's fruktkropp på timotejstrå, <i>Phleum pratense</i> 2012. Foto: Caroline Jöngren
<b>Serietitel, nr:</b>	Examensarbete / Sveriges lantbruksuniversi- tet, Institutionen för norrländsk jordbruksve- tenskap
<b>Delnummer i serien:</b>	nr 1, 2014
<b>Elektronisk publicering:</b>	<a href="http://stud.epsilon.slu.se">http://stud.epsilon.slu.se</a>
<b>Nyckelord:</b>	Endofytiska svampar, <i>Neotyphodium</i> , <i>Epichloë</i> , vallgräs

**Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences**

Fakulteten för naturresurser och jordbruksvetenskap  
Institutionen för norrländsk jordbruksvetenskap

## Sammanfattning

De endofytiska svampsläktena *Neotyphodium* och *Epichloë* tillhör svampdivisionen Ascomycota och har utvecklats tillsammans med, och lever inuti, gräsarter i tempererade delar av världen. Även om svampen parasiterar på gräsplantan kan gräset dra nytta av svampens närvaro då den skyddar mot insektsangrepp och kan ge gräset förbättrad tillväxt. Endofytiska svampar i vallgräs är ett förhållandevis litet forskningsområde i Sverige eftersom endofyterna inte tycks ha påverkat vallproduktionen eller gräsätare i någon större omfattning. En större inverkan har svamparna på vallproduktionen i andra delar av världen där torka och högt betetryck är mer frekvent. Infekterade gräsplantor har en ökad konkurrensfördel jämfört med icke-infekterade gräsplantor i dessa miljöer. En stor betydelse i jordbruket är att *Neotyphodium*, speciellt i vissa sorter av rörsvingel och engelskt rajgräs producerar sekundära metaboliter, alkaloider, som kan orsaka allvarlig förgiftning hos gräsätare. Skador hos produktionsdjur, särskilt i USA, Nya Zeeland och Australien, orsakar stora ekonomiska förluster för lantbrukare vilket har drivit forskningen framåt inom området. I Sverige har endofytisk svamp inte bevisligen orsakat några toxiska effekter hos större produktionsdjur, men endofytiska svampar i gräs förekommer och har studerats i bland annat ängssvingel. Detta har också bekräftats av försöken i denna rapport där endofytisk svamp påträffats i ängssvingelsorterna Norild och Minto. Import av nya vallgräs som kan odlas i allt större områden, tack vare ett varmare klimat, kan öka förekomsten av gräs med endofyter i vårt land. Beroende på vilket gräs som är infekterat kan endofytförekomsten påverka produktionsdjuren negativt. Detta ökar incitamenten att fortsätta forskningen kring analysmetoder av alkaloider i grovfoder, samt kartlägga var och i vilka gräs endofytiska svampar förekommer.

**Nyckelord:** endofytiska svampar, *Neotyphodium*, *Epichloë*, vallgräs

## Abstract

Endophytic fungi refer to the Ascomycota-genera *Neotyphodium* and *Epichloë* that live inside coevolved cool-season grasses. Even though the fungi live of the grass, the host plant is still benefiting from the fungal infection due to growth promoting and pest resistant properties the fungi give. The research area concerning endophytic fungi in cool-season grasses is not examined to any great extent in natural habitats nor in arable land in Sweden. In other places in the world endophytic fungi in grasses, especially *Festuca arundinacea* (tall fescue) and *Lolium perenne* (perennial ryegrass), have a more important role in the establishment and management of forages due to the extended competition properties infected grasses have in environments with heavy grazing and prevalence of heat stress. The back side of the drought resistant and well-performing infected grass is connected with the endophytic fungi's production of secondary metabolites, alkaloids, which can cause toxicity in horses, cattle and sheep. Big losses in the cattle production, including loss of calves, weight loss, aglactica, loss of blood circulation in extremities and nerve-system disorder, have pushed the research further in countries like USA, New Zealand and Australia. *Neotyphodium* and *Epichloë* have been detected in some Swedish grass species, such as *Festuca pratensis* (meadow fescue), but has not been confirmed to cause any toxicity among large herbivores. This paper confirms the presence of endophytic fungi in two of the meadow fescue cultivars, Norild and Minto. Due to a possible climate change towards warmer conditions in Sweden, and increased introduction of tall fescue in the forage production, we could see an increase in endophytic fungi infected grasses that might affect the grazing livestock. There are still grass species and cultivars to test for presence of endophytes, and methods to develop to be able to get grass, hay, haylage and silage examined for toxic alkaloids.

**Keywords:** endophytic fungi, *Neotyphodium*, *Epichloë*, cool-season grass, forage grasses

# Innehållsförteckning

<b>1</b>	<b>Introduktion</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Litteraturstudie</b>	<b>9</b>
2.1	Endofytiska svampar .....	9
2.1.1	Taxonomi .....	9
2.1.2	Släktskap mellan <i>Epichloë</i> och <i>Neotyphodium</i> .....	10
2.1.3	Växtsätt .....	11
2.1.4	Livscykel .....	11
2.1.5	Symbios mellan gräs och endofytiska svampar .....	14
2.1.6	Alkaloider .....	15
<b>3</b>	<b>Detektion av endofyter i några svenska vallgräs</b>	<b>18</b>
3.1	Bakgrund .....	18
3.2	Analys .....	19
3.3	Resultat .....	20
3.4	Diskussion .....	21
	<b>Litteraturlista</b>	<b>24</b>
	<b>Tack</b>	<b>28</b>



# 1 Introduktion

Interaktioner mellan svampar och växter har alltid varit ett intressant och viktigt forskningsområde där en av de mest kända och välstuderade symbioserna är den mellan växtrötter och mykorrhizasvamp som hjälper växten till ett ökat vatten- och näringsupptag. En kanske mindre känd symbios, men välstuderad i vissa länder, är den mellan gräs och svamparter som lever inuti gräset. En endofyt är en organism som lever inuti en växt, och i detta sammanhang är det en svamp som lever i gräsets ovanjordiska växtdelar. Intresset för denna symbios grundar sig på den endofytiska svampens förmåga att ge vissa gräsarter förhöjd torkresistens (Elmi och West 1995), skydd mot patogener (Yue et al. 2000) och förhöjt skydd mot skadeinsekter då svampen producerar gifter i form av alkaloider (Kuldau och Bacon 2008, Schardl et al. 2004). I denna rapport ligger fokus på de endofytiska svampsläktena *Epichloë* och *Neotyphodium* som infekterar gräsarter inom underfamiljen Pooideae vilken inkluderar välkända arter som exempelvis *Festuca pratensis* (ängssvingel), *Lolium perenne* (engelskt rajgräs), *Phleum pratense* (timotej) med flera. Många av dessa gräsarter finns naturligt i t ex betesmarker och ingår i anlagda vallar som skördas och används till grovfoder till häst, får och nötkreatur i Sverige.

En anledning till att uppmärksamma denna symbios är det faktum att vissa endofytiska svampar producerar alkaloider som är toxiska mot herbivorer inklusive boskap. Ett fall av förgiftning hos häst som misstänks vara orsakad av alkaloidproducerande endofytisk svamp upptäcktes på ett travstuteri i Sverige år 2009 (Darenius et al. 2011). Provtagning av hösilaget visade på viss förekomst av endofytisk svamp men orsaken till förgiftningen kunde dock inte kopplas till toxiner i grovfodret då alkaloider inte analyserades. I Sverige har mycket få kvalitativa och kvantitativa studier gjorts av endofytisk svamp i vallgräs vilket innebär att det fortfarande råder osäkerhet kring om och hur gräsätande däggdjur påverkas av tox-

iska alkaloider som kan förekomma i vanliga svenska gräsarter. Det är däremot relativt vanligt i bland annat USA, Nya Zeeland och Australien med förgiftning hos boskap, så kallad ”fescue toxicosis” och ”ryegrass staggers”, orsakad av gräsfoder som varit infekterat av endofytisk svamp i rörsvingel (*Festuca arundinacea*) (Spiers et al. 2005) respektive engelskt rajgräs (*Lolium perenne*) (Everest 1963). Detta är en orsak till att se närmare på förekomsten av alkaloidproducerande endofytiska svampar i svenska förhållanden, speciellt för att förhindra möjliga fall av förgiftning bland våra husdjur, men också för att undersöka alkaloidernas verkan som växtskydd mot nya skadedjur vilka kan introduceras i framtiden i ett varmare klimat.

Syftet med denna rapport är att närmare undersöka förekomst och funktion av *Epichloë* och *Neotyphodium* i olika gräsarter som används inom vallproduktion i Sverige. En litteraturgenomgång beskriver endofyternas livscykel, symbios, släktskap och hur situationen ser ut idag i Sverige. Ett mindre urval av gräsarter och sorter analyserades med avseende på förekomst av endofytiska svampar. Vidare diskuteras hur klimatförändringar kan påverka gräsendofytsymbiosen samt hur och på vilket sätt symbiosen påverkar vallodlingen och grovfoderproduktionen.



## 2 Litteraturstudie

### 2.1 Endofytiska svampar

Endofytiska svampar, som fått sitt namn av grekiskans endo = inom och fyton = växt, är helt beroende av värdväxten för sin överlevnad. När det gäller arter inom släktena *Epichloë* och *Neotyphodium* ingår varje svampart i en symbios med en viss gräsart där de två olika organismerna drar nytta av varandra. Symbiosen innebär att svampen får skydd och all sin näring från gräset, och i gengäld får gräset en ökad konkurrenskraft gentemot icke infekterade gräsplantor i form av t ex skydd mot herbivorer.

#### 2.1.1 Taxonomi

De endofytiska svampsläktena *Epichloë* och *Neotyphodium* ingår i familjen Clavicipitaceae som tillhör klassen *Sordariomycetes* i divisionen sporsäckssvampar, Ascomycota (figur 1). Många svampar inom familjen Clavicipitaceae producerar alkaloider och infekterar flera olika grässorter i underfamiljen Pooideae (Bazely et al. 2007). Till välkända svamparter i familjen Clavicipitaceae som primärt parasiterar växter räknas *Claviceps purpurea* vilken infekterar enskilda blomställningar på gräs och stråsäd och sedan utvecklar vilmycel, sklerotier, i axet på platsen för frön. Sjukdomen kallas i dagligt tal för mjöldryga och har varit känd i agrara miljöer långt tillbaka i tiden (Lee 2009). Mjöl som förorenats av mjöldryga är giftigt för människor.

## FUNGI

**Division:** Ascomycota

**Klass:** Pyrenomycetes (Sordariomycetes)

**Ordning:** Hypocerales

**Familj:** Clavicipitaceae

**Släkte:** *Epichloë*, *Neotyphodium*

Figur 1. Systematik för svampsläktena *Epichloë* och *Neotyphodium*.

### 2.1.2 Släktskap mellan *Epichloë* och *Neotyphodium*

Likheterna mellan *Epichloë* och *Neotyphodium* ser man i den endofytiska livsformen i gräs från samma släkte eller familj, vidare har släktskapet mellan dem också bevisats av Moon et al. (2004). Man har med hjälp av DNA-studier observerat att *Epichloë*s sexuella fortplantning har förändrats till att bli asexuell under tidernas lopp. En sådan förändring kan förklaras med att en *Epichloë*-art infekterat en alternativ värdväxt där ingen tidigare samevolution skett, och därigenom tappat förmågan att bilda fruktkroppar. Ett annat scenario som också diskuterats är att två *Epichloë*-arter infekterat samma växt, smält samman och bildat en asexuell hybrid (Moon et al 2004).

Då man studerat DNA-sekvenser i generna hos olika endofyter har det uppdagats att *Neotyphodium*-arter oftast är resultatet av hybridisering mellan två eller flera olika *Epichloë*-arter, men det finns även arter, t ex *N. lolii*, som inte alls visat sig vara påverkade av hybridisering (Clay och Schardl 2002). Hybrider av sexuella endofytiska svampar visar en tendens att utveckla större och annorlunda formade asexuella sporer än icke hybrider. Sexuella och asexuella hybrider utvecklar även ett större genom med fler baspar än icke hybrider (Clay och Schardl 2002, Kuldau et al. 1999).

Följande exempel visar på släktskap mellan *Neotyphodium*- och *Epichloë*-arter: *N. coenophialum* som är den vanligaste endofyten i rörsvingel i norra Europa har släktband till *E. typhina* och *E. festucae* (Schardl 2009). *Epichloë festucae* som infekterar engelskt rajgräs och ängssvingel har släktband till *N. lolii* som också infekterar engelskt rajgräs (Moon et al. 2004). *Neotyphodium uncinatum*, förekommande i ängssvingel är en hybrid och har släktskap med två andra *Epichloë*-arter (Craven et al. 2001).

Utvecklingen av det asexuella derivatet *Neotyphodium* har visat sig ha stora reproduktionsfördelar då svampen sprids via frön och kan ha en nära hundra procentig infektionsfrekvens (Freeman 1904). Men det har också diskuterats att den effektiva spridningen av *Neotyphodium* och dess ökade förekomst i naturliga gräsbestånd snarare beror på bortfall av icke infekterade plantor då dessa inte haft symbiosens fördelar (Clay 1996, Saikkonen et al. 1998). Till dess nackdel hör oförmågan att föra in nytt genetiskt material och beroendet av värdväxtens frösättning för att själv kunna spridas vidare.

### 2.1.3 Växtsätt

Endofytiska svampars växtsätt ger dem goda förutsättningar att fortleva då växten ger svampen skydd och näring, samt att infektion av gräsfröets embryo gör att svampen kan spridas till nya individer. Svamphyfer i en infekterad planta växer i takt med dess utveckling då den apikala tillväxtzonen bildar blad- och blomanlag. Endofyten angriper blomanlaget och tränger in i fröämnet i samband med befruktningen, infekterar och penetrerar senare embryot i fröet (Philipson och Christey 1986). Medan embryot växer och celldifferentieringen fortgår ökar antalet hyfer mellan cellerna i den apikala tillväxtzonen i det nybildade fröet.

När det infekterade fröet gror växer svamphyferna i takt med växtcellerna och fortsätter sin spridning i gräsets ovanjordiska vegetativa delar (Philipson och Christey 1986). Mellan växtcellerna kan svampen leva av glukos, aminosyror och andra ämnen vilka utsöndras av växtcellerna. Svamphyfer är lokaliserade till plantans strå, bladslidor och blad, men högst koncentration av förgrenade svamphyfer finns fortfarande längst ner i skottbasen (Christensen och Voisey 2009, Schardl et al. 2004). Studier i Nya Zeeland och i Danmark har visat att koncentration av hyfer och mängden alkaloider som produceras ökar under vegetationsperioden (Di Menna och Waller 1986, Jensen och Roulund 2004), vilket också stöds av studier gjorda i Sverige (Puentes et al. 2007).

### 2.1.4 Livscykel

Vanligast hos *Epichloë* och alltid hos *Neotyphodium* är en asexuell livscykel där svampen sprider sig till en ny värdplanta via frön från tidigare infekterade plantor (figur 2). Svampar i släktet *Neotyphodium*, som är en utklyvning av släktet *Epichloë*, har endast ett endofytiskt levnadsmönster (figur 2) och sprids med asexuell förökning vidare till nya värdplantor via gräsets frön (Clay och Schardl 2002,

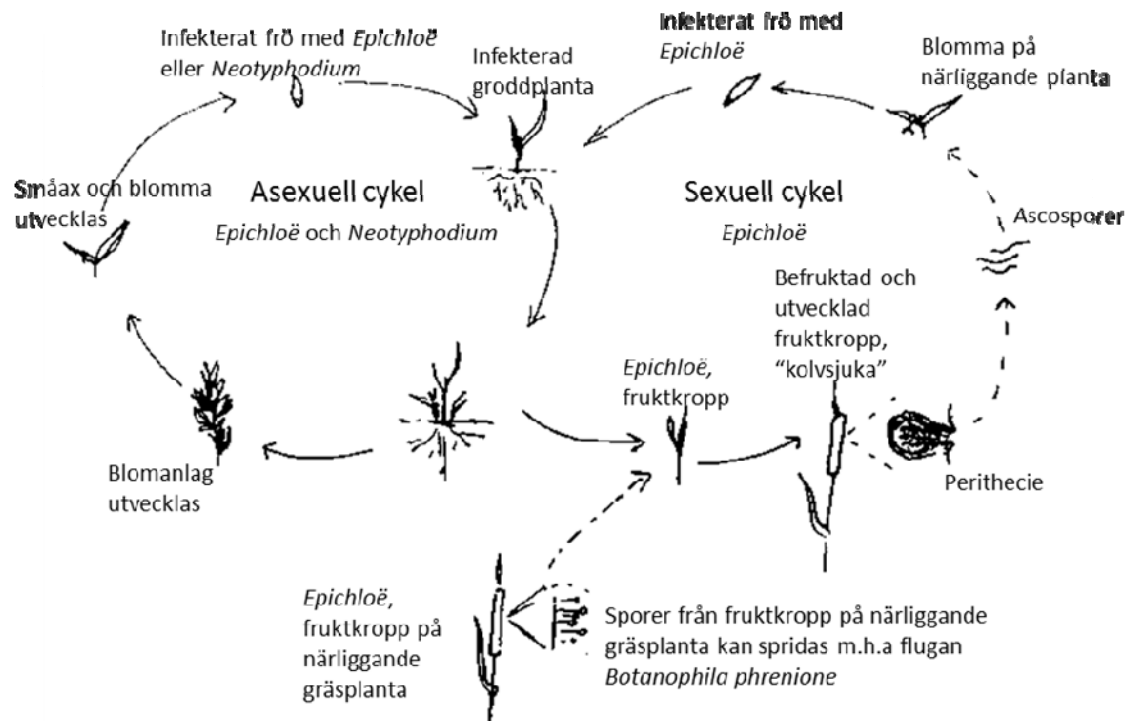
Schardl et al. 2004). En asexuell spridning av detta slag där mycel tillväxer i den infekterade plantans frön leder till en infektion som inte visar några synliga symtom hos gräset. Släktet *Epichloë* har i likhet med sina släktingar ett endofytiskt levnadsmönster, men har även förmåga att under vissa betingelser utveckla en fruktkropp (den del av svampen som bär på sporer) (figur 2).

Bildandet av fruktkroppen innebär att den annars endofytiska svampen växer ut genom gräsets yttersta cellager och en infekterad gräsplanta kan då upptäckas med blotta ögat; man kallar detta symptom i dagligt tal för kolvsjuka (Engqvist och Vestman 1999). En fullt utvecklad fruktkropp känns igen på sin karaktäristiska form, liknande en kolv, där den omsluter flaggblad och strå, samt på dess gulvita färg. Exempel på fruktkropp som utvecklats på timotej kan ses i figur 3. Fruktkroppen ger svampen möjlighet till rekombination mellan olika svampindivider då sporer kan spridas till nya gräsplantor under blomningen (sexuell förökning) (Schardl et al. 2004). Fruktkroppen hämmar dock värdplantas möjlighet till fortplantning då blomanlaget infekteras av endofyten och förhindrar blomanlagets utveckling. Detta leder till lägre skörd när gräset odlas för produktion av gräsfrö.

Kring apikala meristemet (tillväxtzonen), där nya blad och slutligen blomställningen utvecklas och näringstillgången är god, gynnas också tillväxten av *Epichloë*-artens fruktkropp bestående av mycel (Kirby 1961). Huruvida blomanlaget i utvecklingsstadium blir angripet och omsluts av svampens mycel beror av hur snabb tillväxten är i apikala meristemet. Kirby (1961) visade att mycel infekterar blomanlaget då gräsaxet befinner sig i utvecklingsstadiet mellan dubbelringstadiet, då både bladanlag och småaxanlag är synliga och lika stora, och småaxanläggning. En långsammare tillväxt, som ges av lägre temperatur, ger svampen möjlighet att infektera blomanlaget och hindra gräset att utveckla blomställning.

Svampens fruktkropp producerar sporer vilka kan spridas och infektera andra gräs i närheten. Denna spridningsprocess har i andra länder uppmärksamats vara en symbios mellan svampen och flugan *Botanophila phrenione*, som äter av och lägger sina ägg på fruktkroppen, där sporer av olika genotyp från infekterade gräs sprids och kan befrukta varandra (figur 2) (Bultman och Leuchtmann 2008). Ascosporer bildas i små fruktkroppar, perithecier, efter befruktning och sprids sedan med vinden i samband med gräsblomningen då blommande småax på näraliggande plantor infekteras (Bultman och Leuchtmann 2008, Clay och Schardl 2002). När ascosporen gror i gräsblomman börjar hyfer tillväxa och endofyten kolonise-

rar sedan embryot i det nya fröet som är under utveckling. Svampens hyfer kan överleva i frön under flera års tid beroende på omgivningen. Faktorer som hög fuktighet och höga temperaturer under lång lagringstid har dock negativ påverkan på svamphyfernas överlevnad i fröet (Welty et al. 1987).



Figur 2. Asexuell och sexuell livscykel hos endofytiska svampar i gräs. *Neotyphodium* och *Epichloë* växer mellan växtceller inuti grässtrået och sprids asexuellt via infekterade gräsfrön. *Epichloë* kan ibland också växa på gräsets yta och bilda fruktkropp kring gräsets blomställning. En sexuell rekombination kan ske mellan olika svampindivider. Efter befruktning bildas ascosporer som sprids med vinden till gräsblommor i närheten. Efter Clay och Schardl (2002).



Figur 3. Kolvsjuka hos *Phleum pratense*, timotej. Slättervall i Roslagen juni 2012, foto: Caroline Jöngren.

### 2.1.5 Symbios mellan gräs och endofytiska svampar

De flesta arter av *Epichloë* och *Neotyphodium* har ingått i symbios med specifika värdväxter under samevolutionär utveckling. Detta innebär att svamp och gräs har utvecklats parallellt där de haft ett positivt utbyte av varandra. Den endofytiska svampen har funnit en nisch med säker näringstillgång utan större konkurrens från andra mikroorganismer (Kuldau och Bacon 2008) och genom abiotiskt och biotiskt selektionstryck har gräs i symbios med endofytisk svamp överlevt på grund av en högre konkurrensförmåga, ”fitness”. Då gräs inte har förmåga att producera sekundära metaboliter som skyddar mot t ex insektsangrepp har symbios med andra organismer som ger gräset bättre överlevnadsförmåga varit fördelaktigt (Kuldau och Bacon 2008). Symbiosen kan ge gräset bättre resistens mot herbivorer genom endofytens produktion av alkaloider, bättre tillväxt under torka då endofyten sägs ge ökad rottillväxt och påverkar kontroll av klyvöppningar, samt kan ge gräs ökad resistens mot patogener (Kuldau och Bacon 2008, Schardl et al 2004, Elmi och West 1995, Yue et al. 2000).

Förekomst av olika endofytiska svamparter kan särskiljas genom undersökning av de asexuella sporernas och ascosporernas utseende (Kuldau och Bacon 2008) men också genom att studera svamparternas DNA och dess gensekvenser. Förekomsten av *Epichloë* och *Neotyphodium* i svenska förhållanden är ofullständigt undersökt varför det kan vara svårt att få en rättvis bild av vilka gräs som är infekterade och av vilka svamparter. Studier i Schweiz (Leuchtmann et al. 2000) visar på att ängssvingel kan infekteras av *Neotyphodium uncinatum* och *N. siegelii*.

*Festuca rubra* (rödsvingel) infekteras av *Epichloë festucae* (Granath et al. 2007). Wennström (1996) har visat förekomst av *E. typhina* i *Calamagrostis purpurea* (brunnrör) i svenska förhållanden och tidigare har samma svampart uppmärksamats i timotej och *Dactylis glomerata* (hundäxing) (Eriksson 1967). I övriga delar av världen är det känt att *E. festucae* ingår nästan uteslutande i symbios med rajgräs och svinglar samt att den välstuderade *N. coenophialum* återfinns i rörsvingel medan *E. typhina* ingår i flera gräsarter, bland annat i *Anthoxanthum odoratum* (vårbrodd), *Arrhenatherum elatius* (knylhavre), *Brachypodium pinnatum* (backskafting), *Poa* (gröe), hundäxingar, rajgräs och timotej (Schardl 2009, 2010, Schardl och Leuchtmann 2005) (tabell 1). *Epichloë typhina*, som bryter mönstret att ingå i samevolution med endast en värdväxt, har utvecklat olika varianter i olika värdväxter men klassas som en art trots att det inte sker någon rekombination mellan *E. typhina* från de olika värdväxterna (Schardl och Leuchtmann 2005, Schardl 2009).

Tabell 1. Endofytiska svamparter och deras värdväxter samt exempel på alkaloider som produceras. Enligt Schardl (2010).

Endofyt	Värdväxt i Europa	Alkaloider (exempel)
<i>Epichloë typhina</i>	vårbrodd, hundäxing, engelskt rajgräs, timotej, lundgröe, ängsgröe, pärlgröe, kärrgröe, saltgräs, backskafting	peramin
<i>Epichloë festucae</i>	rajgräs, svinglar.	ergovalin, lolitrem, lolin, peramin
<i>Neotyphodium uncinatum</i>	ängssvingel	lolin
<i>Neotyphodium coenophialum</i>	rörsvingel	ergovalin,
<i>Neotyphodium lolii</i> x <i>E. typhina</i>	engelskt rajgräs	lolitrem, peramin, ergovalin

### 2.1.6 Alkaloider

Gräsplantor infekterade med *Epichloë* eller *Neotyphodium* har en konkurrensfördel gentemot andra plantor som saknar endofytisk svamp vilket har observerats i flera studier. Speciellt i utsatta miljöer som vid insektsangrepp eller högt patogentryck kan en infekterad planta klara sig bättre än en icke-infekterad på grund av svampens produktion av sekundära metaboliter, alkaloider (Clay 1996, Leuchtmann et al. 2000, Clay och Schardl 2002). Alkaloider är cykliska kväveföreningar som påverkar herbivorer genom att verka dödande eller avstötande och på så vis skyddar plantan mot angrepp. De alkaloider som produceras av endofytiska svampar innefattar ergotalkaloider, loline, peramin och indollediterpener (Schardl et al. 2004,

Schardl 2009) varav de tre förstnämnda är de mest vanliga i europeiska gräs (Leuchtman et al. 2000). Vidare har Leuchtman et al. (2000) visat att *Neotyphodium*-arter producerar högre koncentration av alkaloider än *Epichloë*-arter, vilket bland flera andra skäl kan bero på att den sexuella fortplantningen hos *Epichloë* är beroende av insekter som skulle avskräckas eller dödas av alkaloider och därmed försvåra svampens fortplantning.

Ergotalkaloider är kända för att vara giftiga och kan orsaka dödsfall hos större däggdjur. Innan rensningen av stråsäd förfinades var det till exempel ett vanligt problem med ergotförgiftning hos produktionsdjur och människor på grund av att fodret innehöll vilkroppar från svampen *Claviceps purpurea*, mjöldryga. *Claviceps purpurea* ingår i samma familj som *Epichloë* och *Neotyphodium* (Schardl 2009) och ergotalkaloiden i mjöldryga är mycket lik alkaloiden ergovalin, som produceras av *Neotyphodium coenophialum* i rörsvingel. Vidare kan ergovalin ge förgiftningssymtom hos större däggdjur, så kallad fescue toxicosis. Detta innefattar hos hästar bland annat reproduktionsproblem såsom dödfödda föl, dålig mjölkproduktion och förlängd dräktighet vilket försvårar fölningen (Cross et al. 1995). Symtom hos nötkreatur är ofta värmeslag, dålig viktuppgång och sammandragning av blodkärl vilket leder till minskad blodcirkulation i extremiteter och kallbrand uppstår (Roberts och Andrae 2004). Man har sett att djuren påverkas mer och får tydligare förgiftningssymtom vid torka och intensivt bete (Keogh et al. 1996), vilket kan förklaras med att koncentrationen av alkaloiderna blir högre i gräset vid torka samt att dålig tillväxt medför att djuren betar mer effektivt nere vid skottbasen där koncentrationen av svamphyfer och därmed också alkaloidkoncentrationen är som störst (Ball et al. 1995, Keogh et al. 1996). Att sköta endofytingfektade vallar är viktigt för att minska risken med insjuknande djur. Exempel på åtgärder är att hugga vallen innan fröställningar utveckas och sprider endofyten vidare till andra plantor, bryta vallen och så in annan grässort som är endofytfri samt att rotera djuren mellan olika vallar för att minska koncentrationen av alkaloider i djurens grovfoderintag (Roberts och Andrae 2004).

Till alkaloidgruppen indolditerpener hör föreningen lolitrem, som främst förknippas med endofyten *N. lolii* i engelskt rajgräs och *E. festucae* i rödsvingel, vilken kan ge upphov till neurologiska skador, så kallad ryegrass staggers, hos boskap (Schardl 2009). Symbiosen mellan *N. lolii* och engelskt rajgräs är vanligt förekommande i Nya Zeeland. I och med stora insektsangrepp av viveln *Listronotus bonariensis* som drabbar rajgräs i det området är endofytingfektade plantor önsk-



värda då peramin, som också produceras av *N. lolii*, skyddar mot angreppen. Endofytens produktion av lolitrem har däremot lett till stora problem med förgiftning av får och nötkreatur vilket fått ekonomiska konsekvenser för lantbrukarna (Everest 1963). Detta dilemma har lett till utveckling av nya genetiska varianter av endofyten där de toxiska föreningarna som påverkar däggdjur reducerats, medan skyddet mot skadegöraren finns kvar (Burton och Easton 2005).

Loliner och peramin är alkaloider som verkar avskräckande på insekter. Peramin produceras av både *Neotyphodium*- och *Epichloë*-arter, bland annat av *N. lolii* som nämnts ovan och *E. typhina* (Clay och Schardl 2002). *Neotyphodium uncinatum*, som infekterar ängssvingel, producerar loliner och ger därigenom en skyddande effekt mot vissa insekter (Leuchtmann et al. 2000, Siegel och Bush 1997). Loliners inverkan på större däggdjur har inte visats ge några större skadliga effekter (Dew et al. 1990).

Endofytens produktion av alkaloider i växten påverkas bland annat av värdväxten, säsong och odlingsmiljön med avseende på näringstillgång och vattentillgång. Fältförsök har visat en förhöjd koncentration av alkaloider under vår och höst medan den minskar under sommaren, och i växthusförsök har en ökad kvävetillgång resulterat i en förhöjd koncentration av ergotalkaloider i växten (Clay och Schardl 2002). Alkaloiderna påverkar gräset positivt då det ger plantan skydd mot herbivorer, men alkaloiderna kan också minska angrepp av patogenen *Rhizoctonia* som orsakar rotröta hos rörsvingel samt minska bladlusens spridning av rödsotvirus då plantor infekterade med *Neotyphodium* är avskräckande för bladlusen (Clay och Schardl 2002).

Ängssvingel är ett av de vanligaste vallgräsen i Sverige och då *N. uncinatum* endast producerar insektsavskräckande alkaloider som loliner, påverkas inte större däggdjur. En större användning av rörsvingel i vallproduktion ökar dock risken för att få in genotyper som utvecklat symbios med *N. coenophialum* vilken kan orsaka ergovalinförgiftning hos våra produktionsdjur. Det är alltså viktigt att kunna mäta alkaloidhalter i gräs, ensilage och hösilage för att säkerställa att grovfoder är säkert att utfodra med. Idag används vanligen HPLC (high pressure liquid chromatography) och masspektrometri för att genomföra dessa analyser (Scott 2007). Analysmöjligheter av alkaloider har dock hittills saknats i Sverige.

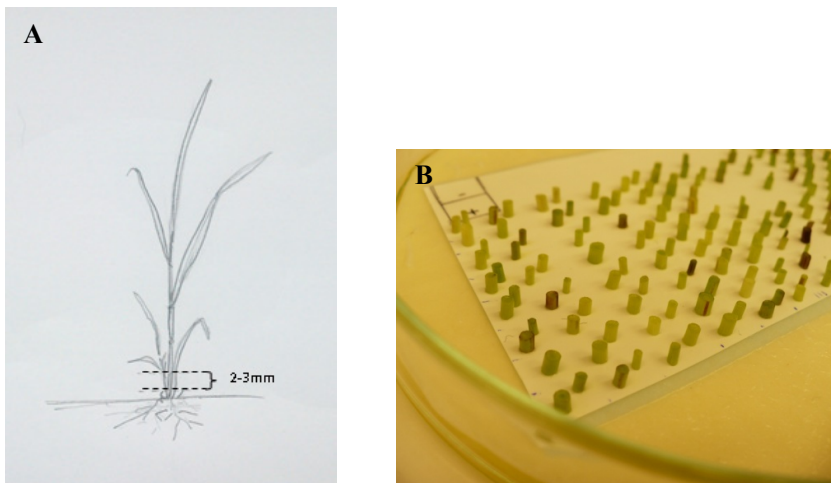
## 3 Detektion av endofyter i några svenska vallgräs

### 3.1 Bakgrund

För att få en inblick i vilka gräs som infekteras av endofytisk svamp i svenska förhållanden analyserades några vanliga gräsarter och grässorter, varav somliga visat förekomst av *Neotyphodium* medan andra inte tidigare blivit analyserade. Analysen genomfördes med hjälp av Phytoscreen field tiller endophyte detection kit, en immunologisk analysmetod utvecklad av företaget Agrinostics, Ltd. Co, Watkinsville, GA, USA. Detta är en tillförlitlig metod för att påvisa endofytisk svamp i rörsvingel och är mer tidseffektiv än mikroskopi då fler prover kan analyseras samtidigt (Hiatt et al. 1999). Phytoscreen field tiller endophyte detection kit fungerar även på några andra gräsarter (Koh et al. 2006). Metoden bygger på att ur gräsprover extrahera ut svampens cellväggspoteiner som tillsatta antikroppar kan binda till, färgas och senare detekteras. Metoden kan användas för analys av frön, färskt och torrt växtmaterial, och genom att studera intensiteten på infärgningen kan kvantitativa mätningar göras då starkare färg har visats korrelera med antal hyfer i provet (Koh et al 2006). Det är dock rekommenderat att kombinera immunoblotmetoden med mikroskopi för att studera svampens hyfer som växer intercellulärt i infekterade gräsplantors blad och skott. Svampen kan också isoleras och studeras i mikroskop då den odlas på potatisdextrosagar där mycel och sporer utvecklas (Christensen et al. 1991). Ytterligare ett alternativ är att använda PCR-teknik (Polymerase chain reaction) där svamp-DNA kan kopieras upp med hjälp av redan kända nukleotidsekvenser från *Neotyphodium* eller *Epichloë*.

### 3.2 Analys

Fyra gräsarter, där tio grässorter ingick (tabell 2), analyserades för infektion av *Neotyphodium/Epichloë* varav ängssvingelsorterna Kasper och Norild i tidigare studier visat på infektion av *Neotyphodium* (Puentes et al. 2007). Gräsen som odlades under normala förhållanden i växthus var av arter och sorter som används inom svensk vallproduktion idag. Fröna såddes i 4-6 rader med 8 frön i varje rad vilket skulle ge 32-48 plantor av varje grässort vid 100 % groningenfrekvens. Efter 7-8 veckor skördades grässkotten ca 1 cm över jordytan. Ett skott analyserades från varje planta, bortsett från bestockade plantor där de två grövsta skotten valdes för att få en säkrare analys i form av tydligare ringar på immunoblot-papperet. Gräsproven rensades från torra döda blad och en jämn snittyta skars med skalpell. Därefter skars 2-4 mm långa bitar från gräsprovets skottbas och placerades med snittytan ner på immunoblotpapperet som ingår i Phytoscreen field tiller endophyte detection kit från Agrinostics (figur 4). Vidare moment utfördes enligt anvisningar från tillverkaren Agrinostics.



Figur 4. **A.** Visar vilken del av gräsplantan som användes till analysen. **B.** Gräsproverna placerades ut på immunoblotpapperet med snittytan nedåt.

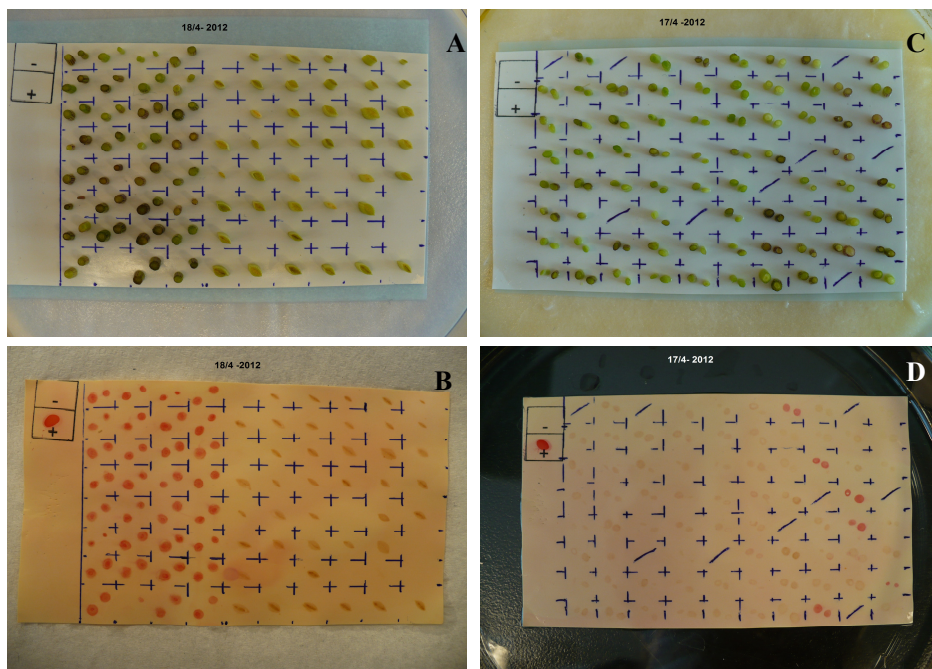
### 3.3 Resultat

En relativt hög groningsfrekvens erhöles från samtliga sorter (tabell 2). Av de tio testade gräsen visade två positiva resultat för *Neotyphodium* varav den ena, ängssvingelsorten Norild, hade infektion i samtliga skott (100 %) och den andra, ängssvingelsorten Minto, hade en infektionsfrekvens på 22 % (figur 5). Analysresultaten av Norild visar att spridning med frön är en mycket effektiv fortlevnadsstrategi för svampen. Ängssvingelsorten Kasper som visat förekomst av *Neotyphodium* i tidigare studier visade inte någon infektion i denna studie.

Tabell 2. Studerade gräsarter och sorter, groningsfrekvens hos fröna och frekvens plantor som visade infektion av endofyter.

Art	Sort (leverantör)	Groningsfrekvens (%)	<i>Neotyphodium</i> (%)
Engelskt rajgräs	Birger (SW Seed)	98	-
Engelskt rajgräs	Felopa (SW Seed)	81	-
Engelskt rajgräs	Helmer (SW Seed)	88	-
Engelskt rajgräs	Malta (SW Seed)	92	-
Engelskt rajgräs	Mathilde (Kastellegården)	96	-
Hundäxing	Laban (NORA <sup>1</sup> )	83	-
Rörsvingelhybrid (rörsvingel x ital.rajgräs)	Hykor (Kastellegården)	100	-
Ängssvingel	Kasper (NORA <sup>1</sup> )	79	-
Ängssvingel	Minto (Kastellegården)	84	22
Ängssvingel	Norild (Scand. Seed)	97	100

<sup>1</sup> Fröer från NORA-projektet (Torvaldsson och Kristjansdóttir 2010).



Figur 5. **A.** Gräsprover till analys med 4 rader av ängssvingel Norild till vänster på immunoblotpapperet och 6 rader av hundäxing Laban till höger. **B.** Resultat efter analys av Norild och Laban. Röda punkter visar på ett positivt utslag av *Epichloë/Neotyphodium* hos Norild. **C.** Gräsprover till analys med 6 rader av engelskt rajgräs Malta till vänster och 4 rader av ängssvingel Minto till höger. **D.** Resultat efter analys av Malta och Minto där den senare visade positivt utslag för *Epichloë/Neotyphodium*.

### 3.4 Diskussion

En nästan hundra procentig gröningsfrekvens och infektion i alla skott hos ängssvingelsorten Norild visar att svampen har en effektiv spridningsstrategi samt att fröerna har lagrats på ett sätt som gynnar både groningen och hyfers överlevnad i fröets embryo, det vill säga i en sval och torr miljö. Att inte alla ängssvingelplanter av sorten Minto är infekterade kan tyda på att fröerna lagrats på ett sådant sätt som missgynnar svampens överlevnad, men det kan också vara ett resultat av att endofyten inte spridits vidare till alla fröer som använts i denna analys. När ett gräs under tillväxt bestockas och sätter frön är det möjligt att svampen inte växer i samma takt som det skott där svampen lever och inte heller infekterar de nybildade fröerna.

Att ingen infektion av *Neotyphodium* visades i ängssvingelsorten Kasper var något förvånande då tidigare studier visat på motsatsen (Puentes et al. 2007, A. Bylin, personligt medd.). Frömaterialet av Kasper, som i detta försök kommer ifrån en studie av gräsarter inom NORA-projekt (Nordiskt Atlantsamarbete) (Torvaldsson och Kristjánsdóttir 2010), har kanske inte lagrats under kontrollerade betingelser vilket kan vara orsak till att eventuella endofyter i frön inte överlevt. Övriga fröer som använts har lagrats torrt och svalt vilket är praxis för att behålla en hög gröningsfrekvens och gynna endofytens överlevnad (Welty et al. 1987). Om de gräs som visat sig vara infekterade av *Neotyphodium* i denna analys kan ha någon påverkan på våra produktionsdjur har inte testats. För detta behövs analys av alkaloidförekomsten i gräset. Ängssvingelns endofyt *Neotyphodium uncinatum* producerar bland annat loliner som främst är toxiska mot invertebrater och det är oklart om endofyten skulle påverka större däggdjur i svenska förhållanden, men tidigare studier visar att loliner inte ger några skadliga effekter hos större däggdjur (Dew et al. 1990) utan snarare har en avskräckande effekt på insekter (Siegel och Bush 1997).

Forskning kring endofytisk svamp i vallgräs i Sverige är hittills av liten omfattning, mestadels på grund av att alkaloiderna inte bevisats orsaka några problem bland våra produktionsdjur och alltså inte medför någon ekonomisk förlust hos djurproducenterna. De vanligaste gräsarterna som odlas i Sverige (timotej och ängssvingel) är ej värdväxter för de *Epichloë*- och *Neotyphodium*-arter som producerar alkaloider som är giftiga för större däggdjur. Vallar innehållande rörsvingel vars endofyt kan orsaka toxiska effekter hos djur är inte vanliga i Sverige och inte heller monokulturer av gräs. Vallfröblandningar, som är mer vanligt i Sverige, ger vallfoder med en blandning av flera arter. Det leder till en utspädnings effekt av alkaloider och de låga koncentrationerna i fodret påverkar därmed inte produktionsdjuren.

Endofytiska svampar i gräs är dock ett intressant område för fortsatt forskning då ett förändrat klimat i Europa kan sätta vallproduktionen i en annan situation än idag: svårare sommartorka kan idag i vissa områden vara ett troligt scenario, nya gräsarter introduceras och nya skadedjur kan spridas längre norrut (Malcolm et al. 2002). Rörsvingelhybrider som introducerats och används i allt högre grad bör undersökas vad gäller endofytförekomst. En större användning av rörsvingel infekterad med *Neotyphodium coenophialum* ger ökad resistens mot torka, men kan bidra till ökade problem med insjuknande djur på grund av endofytens produktion

av ergovalin. Idag finns inga problem i de nordiska länderna med insekts herbivorer som orsakar stora förluster i gräsproduktionen såsom i Nya Zeeland, men nya skadegörare kan introduceras i och med ett varmare klimat. Med en torrare väderlek skulle också svampen kunna förstärka gräsets toleransförmåga vid torka, vilket talar för ett ökat selektionstryck mot arter som är infekterade med endofytisk svamp (Bacon 1993, Clay 1988, Kulda och Bacon 2008).

För att kunna förstå hur endofytiska svampar påverkar den egna gräsfloran samt våra produktionsdjur behövs en mer noggrann kartläggning av dessa svampars förekomst samt utveckling av detektionsmetoder för alkaloider i både färskt gräsmaterial och i hö, hösilage och ensilage. Genom att hitta en effektiv metod för att kunna påvisa levande endofytisk svamp i gräsfrön, utan att behöva odla upp dem, skulle fröleverantörerna lättare kunna ge odlare möjlighet att aktivt välja gräsfrö med eller utan endofytisk svamp. Som nämnts tidigare behövs idag dock incitament för att denna analys ska vara ekonomiskt lönsam och vara relevant för näringen. Men med djupare kunskap skulle vi kunna använda endofytiska svampar för att nå en ökad gräsproduktion i ett torrare klimat och samtidigt kunna förebygga alkaloidförgiftning av våra produktionsdjur.

## Litteraturlista

- Bacon CW, 1993. 'Abiotic stress tolerances (moisture, nutrients) and photosynthesis in endophyte-infected tall fescue', *Agriculture, Ecosystems and Environments*, 44:123-141.
- Bazely, DR, Ball, JP, Vicari, M, Tanentzap, AJ, Bérenger, M, Rakocevic, T, Koh, S, 2007. 'Broad-scale geographic patterns in the distribution of vertically-transmitted, asexual endophytes in four naturally-occurring grasses in Sweden', *Ecography*, 30:367-374.
- Ball, OJ-P, Prestidge RA, Sporsen, JM, 1995. 'Interrelationships between *Acremonium lolii*, peramine, and lolitrem B in perennial ryegrass', *Applied and Environmental Microbiology*, 61:1527-1533.
- Bultman, TL, Leuchtmann, A, 2008. 'Biology of the *Epichloë-Botanophila* interaction: An intriguing association between fungi and insects', *Fungal Biology Reviews*, 22:131-138.
- Burton, J, Easton, S, 2005. 'Endophytes in forage cultivares', In: *Neotyphodium in Cool-Season Grasses*, eds Craig, A, Roberts, CA, West, CP, Spiers, DE, Blackwell Publishing, 327-340.
- Christensen, MJ, Latch, GCM, Tapper, BA, 1991. 'Variation within isolates of *Acremonium* endophytes from perennial rye-grasses', *Mycological Research*, 95:918-923.
- Christensen, MJ, Voisey, CR, 2009. 'Tall fescue-endophyte symbiosis', In: *Agronomy Monographs, Tall Fescue for the Twenty-first Century*, eds Fribourg, H, Hannaway, D, West, C, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, USA, 53:251-272.
- Clay, K, 1988. 'Fungal endophytes of grasses: A defensive mutualism between plants and fungi', *Ecology*, 69:10-16.
- Clay, K, 1996. 'Interactions among fungal endophytes, grasses and herbivores', *Researches on Population Ecology*, 38:191-201.
- Clay, K, Schardl, CL, 2002. 'Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses', *The American Naturalist*, 160:99-127.



- Craven, KD, Blankenship, JD, Leuchtmann, A, Hignight, K, Schardl, CL, 2001. 'Hybrid fungal endophytes symbiotic with the grass *Lolium pratense*', *Sydowia*, 53:44-73.
- Cross, L, Redmond, LM, Strickland, JR, 1995. 'Equine fescue toxicosis: signs and solutions', *Journal of Animal Science*, 73:899-908.
- Darenius, K, Huss-Danell, K, Häggblom, P, Bylin, A, 2011. 'Svampgifter i vallgräs och reproduktionsproblem hos häst', *Svensk Veterinärtidning*, 4:21-24.
- Dew, RK, Boissonneault, GA, Gay, N, Boling, JA, Cross, RJ, Cohen, DA, 1990. 'The effect of the endophyte (*Acremonium coenophialum*) and associated toxin(s) of tall fescue on serum titer response to immunization and spleen cell flow cytometry analysis and response to mitogens', *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 26:285-295.
- Di Menna, ME, Waller, JE, 1986. 'Visual assessment of seasonal changes in amount of mycelium of *Acremonium loliae* in leaf sheaths of perennial ryegrass', *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 29:111-116.
- Elmi, A, West, CP, 1995. 'Endophyte infection effects on stomatal conductance, osmotic adjustment and drought recovery of tall fescue', *New Phytologist*, 131:61-67.
- Engqvist, G, Vestman, G, 1999. 'Faktablad om växtskydd, Jordbruk. 95J', Tillgänglig: [2013-07-16] [www.slu.se/faktabladomvaxtskyddjordbruk](http://www.slu.se/faktabladomvaxtskyddjordbruk).
- Eriksson, O, 1967. 'On graminicolous pyrenomycetes from Fennoscandia. 2 . Phragmosporous and scolecosporous species', *Arkiv för Botanik*, 6:381-440.
- Everest, PG, 1963. 'Ryegrass staggers: an overview of the north Canterbury situation and possible costs to the farmer', In: *Proceeding of the New Zealand Grassland Association*, 44:228-229.
- Freeman, EM, 1904. 'The seed fungus of *Lolium temulentum*, L., the Darnel', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences*, 214:1-28.  
Tillgänglig: [2013-10-19] <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/196/214-224/1.full.pdf+html>.
- Granath, G, Vicari, M, Bazely, DR, Ball, JP, Puentes, A, Rakocevic, T, 2007. 'Variation in the abundance of fungal endophytes in fescue grasses along altitudinal and grazing gradients', *Ecography*, 30:422-430.
- Hiatt, EE, Hill, NS, Bouton, JH, Stuedemann, JA, 1999. 'Tall fescue endophyte detection: commercial immunoblot test kit compared with microscopic analysis', *Crop Science*, 39:796-799.
- Jensen, AMD, Roulund, N, 2004. 'Occurrence of *Neotyphodium* endophytes in permanent grassland with perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in Denmark', *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 104:419-427.

- Keogh, RG, Tapper, BA, Fletcher, RH, 1996. 'Distributions of the fungal endophyte *Acremonium lolii*, and of the alkaloids lolitrem B and peramine, within perennial ryegrass', *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 39:121-127.
- Kirby, EJM, 1961. 'Host-parasite relations in the choke disease of grasses', *Transactions of the British Mycological Society*, 44:493-503.
- Koh, S, Vicari, M, Ball, JP, Rakocevic, T, Zaheer, S, Hik, DS, Bazely, DR, 2006. 'Rapid detection of fungal endophytes in grasses in large-scale studies', *Functional Ecology*, 20:736-742.
- Kuldau, GA, Bacon, CW, 2008. 'Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses', *Biological Control*, 46:57-71.
- Kuldau, GA, Tsai, H-F, Schardl, CL, 1999. 'Genome sizes of *Epichloë* species and anamorphic hybrids', *Mycologia*, 91:776-782.
- Lee, MR, 2009. 'The history of ergot of rye (*Claviceps purpurea*) I: From antiquity to 1900', Rapport från: *The journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, 39:179-184.  
Tillgänglig: [2013-10-18] [http://www.rcpe.ac.uk/journal/issue/journal\\_39\\_2/lee.pdf](http://www.rcpe.ac.uk/journal/issue/journal_39_2/lee.pdf).
- Leuchtmann, A, Schmidt, D, Busch, LP, 2000. 'Different levels of protective alkaloids in grasses with stroma-forming and seed-transmitted *Epichloë/Neotyphodium* endophytes', *Journal of Chemical Ecology*, 26:1025-1036.
- Malcolm, JR, Liu, C, Miller, LB, Allnutt, T, Hansen, L, 2002. 'Global warming and species loss in globally significant terrestrial ecosystems at risk', *WWF, World Wide Fund for Nature*, Gland, Switzerland.
- Moon, CD, Craven, KD, Leuchtmann, A, Clement, L, Schardl, CL, 2004. 'Prevalence of interspecific hybrids amongst asexual fungal endophytes of grasses', *Molecular Ecology*, 13:1455-1467.
- Philipson, MN, Christey, MC, 1986. 'The relationship of host and endophyte during flowering, seed formation, and germination of *Lolium perenne*', *New Zealand Journal of Botany*, 24:125-134.
- Puentes, A, Bazely, DR, Huss-Danell, K, 2007. 'Endophytic fungi in *Festuca pratensis* grown in Swedish agricultural grasslands with different managements', *Symbiosis*, 44:121-126.
- Roberts, C, Andrae, J, 2004. 'Tall fescue toxicosis and management', *Plant Management Network*,  
Tillgänglig: [2013-10-19]  
<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/cm/management/2004/toxicosis/>.
- Saikkonen, K, Faeth, SH, Helander, M, Sullivan, TJ, 1998. 'Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants', *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29:319-343.
- Schardl, CL, Leuchtmann, A, Spiering, MJ, 2004. 'Symbiosis of grasses with seedbourne fungal endophytes', *Annual review Plant Biology*, 55:315-340.

- Schardl, CL, Leuchtmann, A, 2005. 'The *Epichloë* endophytes of grasses and the symbiotic continuum', In: *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*, eds Dighton J, White JF, Oudmans. Boca Raton, FL: CRC Press, 23:475-503.
- Schardl, CL, 2009. 'Fungal endophytes in *Lolium* and *Festuca* species', In: *The Proceedings of the 5th International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf*, 285-298.
- Schardl, CL, 2010. 'The epichloae, symbionts of the grass subfamily Poöideae', *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 97:646-665.
- Scott, PM, 2007. 'Analysis of ergot alkaloids-a review', *Mycotoxin Research*, 23:113-121.
- Siegel, MR, Bush, LP, 1997. 'Toxin production in grass/endophyte associations' In: *The Mycota V, Part A: Plant Relationships*, eds Carroll, G, Tudzynski, P, Springer, Berlin, Heidelberg. 185-207.
- Spiers, DE, Evans, TJ, Rottinghaus, GE, 2005. 'Interaction between thermal stress and fescue toxicosis: animal models and new perspectives', In: *Neotyphodium in Cool-Season Grasses*, eds Craig, A, Roberts, CA, West, CP, Spiers, DE, Blackwell Publishing, 243-271.
- Torvaldsson, G, Kristjánsdóttir, TA, 2010. 'Ræktunarmörk túngrasa og smára á norðlægum slóðum', Tillgänglig: [2012-05-11] <http://www.lifland.is/is/fileman/frodleikur-sadvara/gudni-veggspjald-fraedathing-2010.pdf?fma=viewHere>.
- Wennström, A, 1996. 'The distribution of *Epichloë typhina* in natural plant populations of the host plant *Calamagrostis purpurea*', *Ecography*, 19:377-381.
- Welty, RE, Azevedo, MD, Cooper, TM, 1987. 'Influence of moisture content, temperature, and length of storage on seed germination and survival of endophytic fungi in seeds of tall fescue and perennial ryegrass', *Phytopathology*, 77:893-900.
- Yue, Q, Miller, CJ, White, JF, Richardson, D, 2000. 'Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichloë festuace*', *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 48:4687-4692.

## Tack

Jag vill speciellt tacka min handledare Kerstin Huss-Danell för gott stöd, inspiration och uppmuntran under arbetet med denna rapport och Anja Bylin som gav goda råd och handledde laborationsarbetet vid analysen av gräsproverna.